

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen über
die Cholinesteraserestaktivität
menschlicher Seren
bei Vergiftung mit E 600

Untersuchungen an 57 weiblichen Probanden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Werner Aichinger
aus Ettringen

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Untersuchungen über
die Cholinesteraserestaktivität
menschlicher Seren
bei Vergiftung mit E 600

Untersuchungen an 57 weiblichen Probanden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Werner Aichinger
aus Ettringen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Februar 1976

In Dankbarkeit meinen lieben Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

- I. Einleitung
- II. Problemstellung
- III. Experimentelle Untersuchungen
 1. Versuchsanordnung
 - a. Gewinnung des Serums
 - b. Angewandtes Meßverfahren
 - c. Inkubation mit E 600 (Paraoxon)
 - d. Messung der Cholinesteraseaktivität
 2. Versuchsergebnisse
 3. Auswertung
- IV. Diskussion und Zusammenfassung
- V. Literaturverzeichnis

I. Einleitung

Zur Charakterisierung der Toxizität von Alkylphosphaten wird oft die molare Konzentration an Wirkstoff angegeben, die in der Lage ist, die Aktivität von Cholinesterasen auf die Hälfte zu erniedrigen (I_{50}). Dieser Wert ist von der Art der Cholinesterase sowie auch den Versuchsbedingungen abhängig. Für E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) und Serumcholinesterasen sind in der Literatur Werte entsprechend Tabelle I genannt.

Tabelle I

I_{50} - Werte für Serumcholinesterasen verschiedener Herkunft (aus der Literatur)

Herkunft des Serums	I_{50}	Autor
?	$1,4 \times 10^{-7}$	Schrader (1963)
Pferd	$1,4 \times 10^{-7}$	Heath (1961)
Ratte	$2,63 \times 10^{-8}$	Heath (1961)
?	$1,26 \times 10^{-7}$	Heath (1961)
Mensch	$0,87 \times 10^{-8}$	Rosival u. Mitarb. (1959)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT und LINDORF (1969) sowie GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, RABAST und LINDORF (1969) haben nach Inkubation menschlicher Serumcholinesterase mit E 600 unterschiedliche Vergiftungsgrade des Fermentes durch den Hemmstoff festgestellt. Bei Messungen der Cholinesterase-

aktivität von 192 menschlichen Seren nach Inkubation mit E 600 in $3,2 \times 10^{-8}$ molarer Konzentration fanden sie unabhängig von der Ausgangsaktivität eine Aufteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität (siehe Tabelle II).

Tabelle II

Serumcholinesterase-Restaktivität in Prozent der Ausgangsaktivität von 192 menschlichen Seren nach Vergiftung mit Paraoxon ($3,2 \times 10^{-8}$ M). (Anti-ChE-Technik nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT et.al., 1969)

n	Gruppe	Cholinesterase-Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	
		gemessener Wert	mittlere Restaktivität mit Standardabweichung
128	I	0,0 - 6,0	2,5 $\pm$ 1,1
46	II	12,0 - 22,0	17,2 $\pm$ 2,2
18	III	30,0 - 50,0	39,6 $\pm$ 5,1

Die gefundenen Unterschiede in der Restaktivität der Serumcholinesterasen nach Inkubation in vitro mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) in bestimmter Konzentration, warfen eine Reihe von Fragen auf, besonders nach der Verteilung in der Bevölkerung und einer eventuell genetischen Bedingtheit. Wie GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, BAUMGARTNER, PETENYI, BURGIS, LINDORF und METZNER (1972) bei 50 Versuchspersonen zeigten, besteht zwischen Serum-

cholinesterase-Restaktivität nach Vergiftung mit E 600 und der Aktivität der Serum-Arylesterase (Paraaxonase, E.C.3.1.1.2.) eine hochsignifikante Korrelation, derart, daß eine hohe Cholinesterase-Restaktivität einer hohen Paraaxonase-Aktivität entspricht.

Nach GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, PETENYI, FLÜGEL, BURGIS, DIETZEL, METZNER, NIRSCHL und RENNER (1973) ist die menschliche Serum-Paraaxonase ein sehr spezifisches Enzym, das schon auf geringfügige Veränderungen am Substratmolekül reagiert.

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER (1973) haben gezeigt, daß die menschliche Serum-Paraaxonase einen Polymorphismus aufweist. Wie Untersuchungen an 35 Familien mit 52 Kindern ergaben ist dieser wahrscheinlich genetisch determiniert und folgt einem einfachen 2-Allele-Modell.

II. Problemstellung

Um die gefundenen Unterschiede der Restaktivität der Serumcholinesterasen weiter zu erforschen, wurde in der vorliegenden Arbeit Serum von 57 weiblichen Probanden untersucht, um insbesondere die Verteilung der drei Gruppen in der Bevölkerung festzulegen.

Die Hauptaufgabe lag darin, eventuelle Geschlechtsunterschiede festzustellen.

Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit 57 Seren von weiblichen Probanden untersucht, um einen Vergleich mit der Arbeit von PECHMANN, der ausschließlich Seren männlicher Probanden verwandte, zu ermöglichen.

Als Substrat diente Butyrylcholinjodid.

III. Experimentelle Untersuchungen

1. Versuchsanordnung

Methodik zur Messung der Serum-Cholinesteraseaktivität mit Butyrylcholinjodid als Substrat (in der Warburg-Apparatur).

a. Gewinnung des Serums

Es wurde 57 gesunden, und zwar weiblichen Probanden im Alter von 16 bis zu 72 Jahren, 10 ml Blut entnommen, das etwa eine halbe Stunde nach der Entnahme 15 min bei 1600 U/min zentrifugiert wurde, wobei das überstehende Serum nicht hämolytisch werden sollte. Das erhaltene Serum wurde sofort abgetrennt und spätestens zwei Tage danach die Messung durchgeführt. Für die Zwischenzeit erfolgte eine Aufbewahrung im Kühlschrank bei + 5 Grad Celsius.

b. Angewandtes Meßverfahren

Die Serumcholinesteraseaktivität wurde in einer Warburg-Apparatur Typ V 85 der Firma Braun, Melsungen, mit der manometrischen Methode von AMMON (1934) in der Modifikation von FRIEDBERG und SAKAI (1958), jedoch bei einem pH-Wert von 7,2 bestimmt. Die Bedingungen der Inkubation mit E 600 wurden auf die nachfolgenden Aktivitätsmessungen abgestimmt. (GELDMACHER-v. MOLLINCKRODT, LINDORF, PETENYI, FLÜGEL, FISCHER und HILLER 1973)

c. Inkubation mit E 600 (Paraoxon)

Für die Vergiftung des Fermentes wurden 1 µl E 600 auf 90 ml H₂O gegeben. Je 10 ml dieser Lösung wurden dann zu 13,5 ml der als Verdünnungslösung für das Serum verwendeten Salzlösung, gebracht. Diese Verdünnungslösung war eine Mischung aus 10 Teilen einer 0,9 %-igen NaCl-Lösung

und 3 Teilen einer 1,26 %- igen NaHCO_3 -Lösung. Vor Gebrauch wurde sie mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% N_2 durchströmt.

Zur Vergiftung wurden 0,15 ml Serum mit 1,35 ml der E 600-haltigen Verdünnungslösung verdünnt. Die E 600-Konzentration im Inkubationsansatz war $c = 3,2 \times 10^{-8}$ molar.

Die Ansätze wurden sofort in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Von den Inkubationsansätzen wurden je 0,5 ml in die Anhangsbirne eines Warburggefäßes gegeben, das im Hauptraum 1,5 ml einer 0,54% - igen wässrigen Lösung von Butyrylcholinjodid enthielt. Die Warburggefäße wurden nun am Manometer angeschlossen und 20 min in ein Wasserbad von 37°C gebracht. Anschließend wurden alle Manometer mit einem Gasgemisch aus 5% CO_2 und 95% N_2 begast. Nach dem Begasen wurde noch so lange bei 37°C inkubiert, daß eine Gesamt-Inkubationszeit von 60 min erreicht war. Der pH-Wert lag während der Inkubation etwa bei 7,7 (SÜLLMANN).

d. Messung der Cholinesteraseaktivität

Nach beendeter Inkubation wurde die Serumverdünnung in der Anhangsbirne in den Hauptraum der Warburggefäße gekippt. Der pH-Wert lag nun bei 7,2 (SÜLLMANN, 1964).

Es wurde bei geöffneten Hähnen 3 min geschüttelt (Schüttelfrequenz 100/min) und anschließend die Manometergefäße geschlossen. Der Manometerstand wurde sodann 30 min lang alle 15 min abgelesen.

Die Seren wurden in Doppelbestimmung mit und ohne E 600 bei Verwendung von Butyrylcholinjodid als Substrat auf ihre Restaktivität getestet. Zur Kontrolle liefen je Versuch zwei Leerwerte mit, in welchen die Anhangsbirne des

Kölbchens nur Verdünnungslösung enthielt, wodurch die Eigenhydrolyse des Substrates erfaßt wurde. Diese Doppelbestimmung wurde zweimal durchgeführt, sodaß in zwei Versuchsabläufen drei Seren mit jeweils insgesamt vier Leerwerten, vier unvergifteten und vier vergifteten Ansätzen auf ihre Restaktivität geprüft wurden. Es wurde darauf geachtet, ob der Anstieg der Manometersäulen linear erfolgte. War diese Forderung erfüllt, wurden die 30 min-Werte der Doppelmessung mit der entsprechenden Manometerkonstanten (SULLMANN, 1964) multipliziert. Ebenso wurde der Leerwert errechnet. Sodann wurde das arithmetische Mittel beider Wertpaare gebildet und der Leerwert von der Fermentmessung abgezogen. Auf die gleiche Weise wurde der zweite Versuchslauf ausgewertet und aus beiden Ergebnissen wiederum das arithmetische Mittel gebildet.

2. Versuchsergebnisse

Die an 57 Personen gewonnenen Versuchsergebnisse sind in Tabelle III zusammengestellt und in Abbildung I graphisch dargestellt.

Tabelle III

Versuchsergebnisse der Messungen der Serum-Cholinesterase-Aktivität mit dem Substrat Butyrylcholinjodid ohne und mit Vergiftung mit E 600 bei 57 weiblichen Versuchspersonen.

Versuchspersonen	Alter Jahre	Mittelw. der ChE- Aktivitäten		Mittelwert der Rest- aktivität in % der Ausgang- aktivität nach Ver- giftung	Blut- gruppe (ABO) und Rh- Faktor
		vor	nach		
		(in μ l CO ₂ /30 min)			
Niedriger Typ = Gruppe I					
Herlitzer Anna	45	132,1	2,7	2,01	A ₁ +
Bauernfeind L.	18	168,1	3,5	2,09	-----
Dietrich Adele	36	126,2	2,7	2,18	-----
Hausner Angela	24	142,2	4,3	3,01	O +
Kraus Maria	69	162,0	5,0	3,16	-----
Schedel Josefine	20	139,8	4,5	3,21	-----
Ganguth Veronika	32	163,6	5,5	3,39	-----
Schwarz Anna	50	167,5	5,8	3,46	-----
Aichinger Rosa	71	153,0	5,5	3,63	-----
Bunkert Christa	22	142,7	5,6	3,93	-----
Cerny Brigitte	24	180,7	7,3	4,09	A ₁ +
Schmitt Gunda	37	163,4	6,8	4,18	O +
Selent Therese	38	160,0	7,4	4,65	O +
Maier Afra	60	223,5	10,4	4,67	-----
Müller Hilde	23	131,2	6,8	5,23	-----
Andersen Ute	21	170,9	9,3	5,43	A ₂ B -
Grattner Regis	24	145,1	8,0	5,56	-----

Pichl Therese	72	159,0	8,4	5,58	-----
Pechmann Rosa	60	73,5	4,1	5,71	-----
Sukow Iris	17	187,3	11,0	5,92	-----
Minderle C.	18	171,7	10,2	5,95	-----
Aichinger G.	46	227,2	13,6	5,99	-----
Steiner A.	19	185,1	11,2	6,03	-----
Friedrich A.	18	177,4	10,9	6,66	A ₁ +

Mittlerer Typ = Gruppe II

Braun Rosmarie	32	106,8	12,5	11,71	-----
Lederer Josefina	47	264,0	31,2	11,82	-----
Preisinger R.	58	241,6	28,8	11,92	-----
Neuner Angelika	19	110,1	13,5	12,30	-----
Dietz Siegfried	41	100,5	12,8	12,79	-----
Aichinger Gerti	21	162,8	20,1	12,88	-----
Göller Helga	18	174,6	24,6	14,07	-----
Dietrich Ulrike	16	105,2	15,5	14,76	-----
Knorr Elisabeth	21	232,8	35,9	15,41	-----
Schuster V.	24	96,9	15,2	15,77	0 +
Friedl Resi	21	211,9	34,3	16,25	-----
Krusche Bärbl	34	115,3	18,5	16,82	-----
Teichmann B.	18	152,7	25,7	16,82	-----
Berg Renate	21	193,5	32,6	16,93	B +
Dietz Gudrun	18	175,7	26,7	17,71	-----
Häfner A.	22	106,8	20,4	19,11	-----
Erlwein Marga	22	171,2	36,7	19,26	-----
Stöhr Ina	24	207,6	40,2	19,38	-----
Horst Margarete	51	214,1	41,9	19,58	-----
Seitz Marga	43	215,8	44,1	20,46	-----
Weidner Beatrice	18	207,8	43,3	21,26	-----
Dolp Maria	52	244,8	53,6	21,91	-----
Wirth Isolde	19	183,7	40,5	22,05	-----

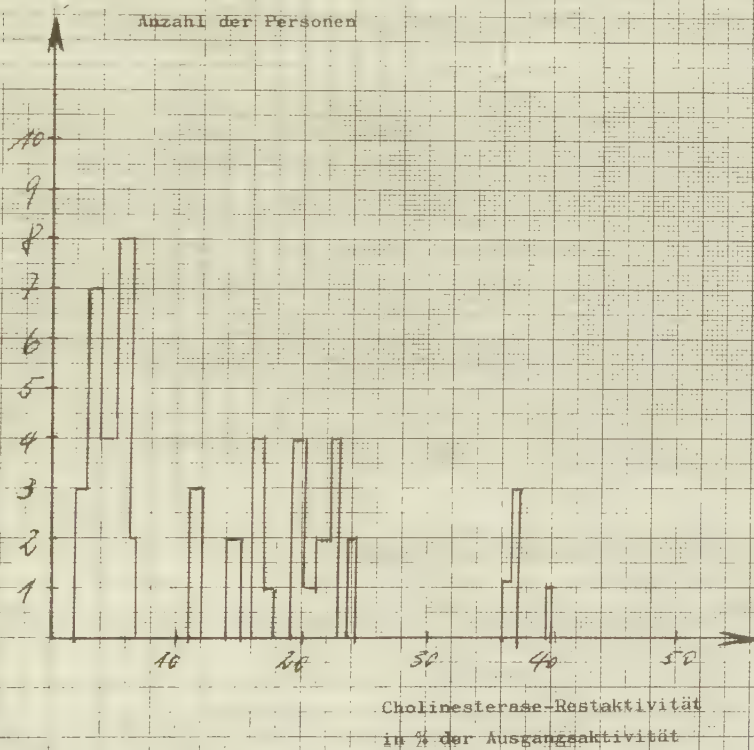
Preußner Doris	21	258,3	57,0	22,08	-----
Frank Barbara	25	142,3	31,6	22,23	-----
v. Hacht S.	18	169,6	38,8	22,89	-----
Reins Greta	40	188,3	45,5	24,19	-----
Ochs Brigitte	25	192,2	47,2	24,69	-----

Hoher Typ = Gruppe III

Kuhn Elfriede	34	174,0	64,2	36,77	-----
Günther Ute	20	192,7	71,9	37,28	-----
Müller Marianne	18	218,3	81,8	37,46	-----
Strassmair M.	40	183,9	69,7	37,91	-----
Fink Hermine	35	184,9	75,1	40,59	λ_2 +

Abb. 1

GESAMTVERTEILUNG DER CHOLINESTERASE-
RESTAKTIVITÄT VON 57 PROBANDEN



3. Auswertung

Die einzelnen Gruppen ließen sich unter Verwendung von Butyrylcholinjodid gut unterscheiden, wobei die Gruppe niedriger E 600-spaltender Aktivität eine durchschnittliche Restaktivität von 4,82 %, die mittlere Gruppe eine durchschnittliche Restaktivität von 17,75 % und die hohe Gruppe von 38,00 % aufwies.

Die Verteilung in dem untersuchten Material ergibt sich aus folgender Aufstellung:

Gruppe	Anzahl der Probanden	in %
niedrig	24	42
mittel	28	49
hoch	5	9
gesamt	57	100

IV. Diskussion und Zusammenfassung

Die von GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF und RABAST (1969) gefundenen Unterschiede in der Vergiftbarkeit menschlicher Serum-Cholinesterasen mit 2 500 (Paraoxon, O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-phosphat) machten schon bei der relativ kleinen Zahl (50 Seren) der untersuchten Seren eine Einteilung in drei Gruppen mit niedriger, mittlerer und hoher Restaktivität möglich. Ursache hierfür ist, wie weitere Untersuchungen zeigten, eine unterschiedliche Paraoxonase-Aktivität, die über die Cholinesterase-Restaktivität sehr sicher zu bestimmen ist.

Die vorliegende Arbeit ist ein Beitrag zur Aufklärung der Verteilung der drei Gruppen bei Frauen, die zwar eine zuverlässige Aussage über die Gesamtverteilung in der Bevölkerung nicht zulässt, aber doch ähnliche Ergebnisse wie bei GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, LINDORF und RABAST zeigt. Sie fanden:

	Gruppe	mittlere Cholinesterase- Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Anteil der Probanden in %
I	niedrig	2,50	66
II	mittel	17,20	25
III	hoch	39,60	9

Im Vergleich hierzu die Ergebnisse dieser Arbeit:

I	niedrig	4,82	42
II	mittel	17,75	49
III	hoch	38,00	9

In Übereinstimmung damit stehen die Ergebnisse von PECHMANN, der 45 männliche Probanden untersuchte.

Er fand:

Gruppe	mittlere Cholinesterase- Restaktivität in % der Ausgangsaktivität	Anteil der Probanden in %
I niedrig	4,57	53
II mittel	18,70	40
III hoch	38,13	7

Im Vergleich mit der Arbeit von PECHMANN, der Männer untersuchte, konnte kein Zusammenhang zwischen Geschlecht der Probanden und der Cholinesterase-Restaktivität namhaft gemacht werden.

Für gesicherte statistische Aussagen sind weitere Untersuchungen unerlässlich.

V. Literaturverzeichnis

1. AMMON, R.:

Die fermentative Spaltung des Acetylcholins
Pflügers Arch. ges. Physiol. 233, 486 (1934)

2. FRIEDBERG, K.D. und SAKAI :

Spezifischer Nachweis von Vergiftungen mit Al-
kylphosphaten (E 600, E 605, Systox) im Blut und
Hirngewebe mit Hilfe eines fermentreaktivierenden
Antidots (Pyridin-Aldoxim-Methyljodid, PAM)
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 47, 580 (1958)

3. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., W. BAUMGARTNER, M. PETENYI, H. BURGIS, H.H. LINDORF und H. METZNER:

Korrelation zwischen der unterschiedlichen Ver-
giftbarkeit der Serum-Cholinesterase durch E 600
und der Aktivität des E 600-spaltenden Enzym-
Systems in menschlichen Seren
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 217 (1972)

4. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M. und H.H. LINDORF:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
Cholinesterasen mit Alkylphosphaten
Vortrag auf der 48. Tagung der deutschen Gesell-
schaft für Rechtsmedizin in Berlin, 6. - 9.10.69

5. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., LINDORF, H.H.,
PETENYI, M., FLÜGEL, M., FISCHER, TH. und
HILLER, TH.:

Genetisch determinierter Polymorphismus der
menschlichen Serum-Paraoxonase (E.C.3.1.1.2.)
Humangenetik 17, 331 - 335 (1973)

6. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., PETENYI, M.,
FLÜGEL, M., BURGIS, H., DIETZEL, B., METZNER, M.,
NIRSCHL, H. und RENNER, C.:

Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 337 - 340
(März 1973)

7. GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M., U. RABAST und
H.H. LINDORF:

Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-
Cholinesterase mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-
(p-nitrophenyl)-phosphat)
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969)

8. HEATH, D.F.:

Organophosphorus poisons
Oxford-London-New York-Paris: Pergamon (1961)

9. KIMMERLE, G. und D. LORKE:

Die Toxikologie der insektiziden Phosphorsäureester
Pflanzenschutznachrichten Bayer 21, 111 (1968)

10. KRISCH, K.:

Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenyl-
-phosphat (E 600) durch menschliches Serum
Z. klin. Chem. und klin. Biochem. 6, 41 (1967)

11. ROSIVAL, VROBOVSKY and SELECKY:

Toxokologia a farmakoboidynamika organo-
fosforovich zlucenin, Bratislava 1959
Zit. nach KIMMERLE und LORKE, 1968

12. SCHRADER, G.:

Die Entwicklung neuer insektizider Phosphorsäure-
ester
Weinheim / Bergstr.: Verlag Chemie, 1963

13. SÜLLMANN, E.:

Manometrische Methoden zur Untersuchung des
Gewebestoffwechsels
In: Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-
Chemischen Analyse, hrsg. von K. Lang und E. Lehn-
arzt, Bd. VI A, Teil A. Berlin-Göttingen-Heidelberg-
New York: Springer 1964

14. WHITTAKER, M.:

The pseudocholinesterase variants. Differentiation
by means of alkyl alcohols
Acta genet. (Basel) 18, 325 (1968)

Zum Schluß der Arbeit erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut und die freundliche Übernahme des Korreferates meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Anregungen und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 23. 8. 1948 wurde ich, Werner Aichinger, in Ettringen, Kreis Mindelheim, geboren.

Dort besuchte ich fünf Jahre die Volksschule und wechselte dann ins Maristenkolleg, einem math.-nat. Gymnasium in Mindelheim, wo ich im Jahre 1969 mein Abitur ablegte.

Im Sommersemester 1970 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen im Fach Medizin.

Nach dem Wintersemester 70/71 absolvierte ich das Vorphysikum, nach dem Sommersemester 1972 das Physikum.

Bald nach dem Physikum begann ich am Institut für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg mit den Untersuchungen im Rahmen dieser Doktorarbeit.

~~Im Sommersemester 1975 beendete ich nicht nur die ärztliche Prüfung~~

Am 30. Januar 1976 bestand ich die Ärztliche Prüfung.

Werner Aichinger

Copy - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197